

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE



Vliv kancerogenního azobarviva Sudanu I na expresi biotransformačních enzymů

*The effect of cancerogenic azo dye Sudan I on
expression of biotransformation enzymes*

Bakalářská práce

Žaneta Hejduková
školitelka: RNDr. Dagmar Svášková, Ph.D.

Praha 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Dagmar Sváškové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 4.6.2010

Žaneta Hejduková

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí práce RNDr. Dagmar Sváškové, Ph.D. za její trpělivost, ochotu a cenné rady, připomínky a námitky, díky kterým bylo možné mou práci dokončit.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D.; RNDr. Věře Kotrbové, Ph.D.; RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. a Bc. Janu Milichovskému za pomoc při studiu a vždy příjemnou spolupráci v laboratoři.

V neposlední řadě děkuji mým rodičům - Haně a Ivovi Hejdukovým, Tomáši Hejdukovi, Petru Matolínovi a Květě Garčkové, kteří mi byli při psaní této práce velkou oporou.

Abstrakt

Sudan I je poměrně hojně používaným azobarvivem, které má schopnost vyvolat tvorbu nádorů v orgánech a tkáních experimentálních zvířat. V průběhu reakcí katalyzovaných mikrosomálními monooxygenasovými enzymovými systémy nebo cytoplazmatickými derivatizačními enzymy je Sudan I oxidován na reaktivní metabolity, které se kovalentně vážou na nukleové kyseliny a způsobují jejich poškození. Sudan I může být metabolizován i redukční cestou, např. enzymem DT-diaforasou (NQO1). Redukce Sudanu I jsou považovány za reakce detoxikační. Působení Sudanu I *in vivo* je v této práci zkoumáno z hlediska schopnosti indukovat expresi biotransformačního enzymu DT-diaforasy ve tkáních potkanů premedikovaných daným azobarvivem. Cílem práce bylo konkrétně kvantifikovat míru indukce na úrovni mRNA. Po provedení izolace celkové RNA z orgánů potkanů premedikovaných Sudanem I byla RNA převedena na cDNA pomocí reverzní transkripce s využitím náhodných hexamerů jako primerů. Metodou “real-time“ PCR s použitím specifických sond bylo kvantifikováno zastoupení mRNA pro enzym NQO1 v orgánech premedikovaných potkanů, relativně vůči kontrolnímu genu s konstantní expresí (β -aktin). Porovnáním takto stanovených množství mRNA v jednotlivých orgánech pro premedikované a nepremedikované potkany bylo zjištěno, že Sudan I vyvolal signifikantní zvýšení exprese enzymu NQO1 v ledvinách a plicích (14- resp. 4-násobné množství mRNA oproti kontrole), v játrech byla hladina mRNA pro NQO1 zvýšena nesignifikantně. Tato práce přispívá svými poznatky k rozšíření znalostí o indukčním působení azobarviva Sudanu I na enzymy účastnící se jeho vlastní přeměny *in vivo* a tedy schopnosti Sudanu I modulovat svůj vlastní metabolismus při opakované expozici.

(In Czech)

Klíčová slova:

Sudan I, DT-diaforasa, NQO1, exprese genu, Ah receptor, mRNA, real-time PCR

Abstract

Sudan I is a widely used azo dye which has the ability to cause carcinomas in organs and tissues of experimental animals. During reactions catalyzed by microsomal monooxygenase enzyme systems or cytoplasmic biotransformation enzymes, Sudan I is oxidized to reactive metabolites that covalently bind to nucleic acids and cause their damage. Sudan I can also be metabolized by reduction, e. g. by a DT-diaphorase enzyme (NQO1). Reduction of Sudan I is considered to be a detoxification reaction. In this work, the *in vivo* action of Sudan I is examined in terms of its ability to induce an expression of the biotransformation enzyme DT-diaphorase in tissues of rats treated with the azo dye. The aim of this work was to quantify the degree of NQO1 induction at mRNA level. After the isolation of total RNA from organs of rats treated with Sudan I, the RNA was converted to cDNA by reverse transcription using random hexamers as primers. Using specific probes, the abundance of mRNA for the enzyme NQO1 in the organs of treated rats was quantified by “real-time“ PCR, relatively to the control gene with a constant expression (β -actin). Through comparing thus determined amounts of mRNA in individual organs of treated and untreated rats, it has been found that Sudan I had caused a significant increase in the expression of NQO1 enzyme in kidney and lungs (14- and 4-times, respectively, the amount of mRNA when compared to the control sample), whereas in liver the induction of NQO1 mRNA was not significant. This work contributes with its findings to the expansion of knowledge on the induction activity of an azo dye Sudan I on the enzymes involved in its own transformation *in vivo* and, therefore, on the ability of Sudan I to modulate its own metabolism during a repeated exposure.

Keywords:

Sudan I, DT-diaphorase, NQO1, gene expression, Ah receptor, mRNA, real-time PCR

Obsah

1	Teoretický úvod.....	8
1.1	Azobarviva	9
1.1.1	Aromatické aminy	10
1.1.2	Izomerie v azobarvivech	10
1.1.3	Metabolismus azobarviv	11
1.1.4	Sudan I	11
1.2	DT-diaforasa (NQO1)	15
1.2.1	Katalytický cyklus enzymu	16
1.2.2	Detoxifikační reakce katalyzované DT-diaforasou	16
1.2.3	Expresce genu pro NQO1	17
1.2.4	Polymorfismus NQO1	18
1.3	Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR)	19
1.3.1	Struktura Ah receptoru	19
1.3.2	Mechanismus aktivace Ah receptoru	20
1.3.3	Regulace AhR - signální dráhy	21
2	Cíl bakalářské práce	23
3	Experimentální část	24
3.1	Použitý materiál a chemikálie	24
3.2	Použité metody	25
3.2.1	Premedikace potkanů	25
3.2.2	Izolace celkové RNA	25
3.2.3	Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu	26
3.2.4	Určení koncentrace a čistoty RNA	27
3.2.5	Reverzní transkripce	27
3.2.6	“Real-time“ polymerasová řetězová reakce	28
4	Výsledky.....	31
4.1	Izolace celkové RNA.....	31
4.2	Kvantifikace získané RNA pro NQO1 pomocí reverzní transkripce a “real-time“ PCR	33
5	Diskuze.....	37
6	Závěr	39

Seznam použitých zkratek

AhR,Ah receptor	receptor aromatických uhlovodíků
AhRR	represor receptoru aromatických uhlovodíků
ARNT	jaderný translokátor receptoru aromatických uhlovodíků
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP, P450	cytochrom(y) P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
DRE	sekvence “dioxin response element“
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FADH₂	flavinadenindinukleotid (redukováná forma)
Hsp90	protein teplotního šoku o molekulové hmotnosti 90kDa
HLH	doména “helix-loop-helix“
ILP	“imunophilin-like“ protein
MQ voda	deionizovaná voda
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukováná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováná forma)
NQO1	NAD(P)H : chinon oxidoreduktasa; DT-diaforasa
PAS	doména “Per-Arnt-Sim“
PCR	polymerasová řetězová reakce
RNA	(celková) ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TCDD	2,3,7,8 – tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
RT-PCR	PCR s reverzní transkriptasou
UVB	ultrafialové záření v rozsahu 280 – 315 nm

1 Teoretický úvod

Vývoj nových technologií v oblasti průmyslu a zemědělství a hromadění nejrozumnějších cizorodých látek (xenobiotik) v životním prostředí jdou ruku v ruce. Jedná se povětšinou o sloučeniny, které mají negativní vliv na zdravotní stav lidské populace. Nejvíce problematické jsou látky, které jsou pro organismy potenciálně toxické a dále pak ty, které se v prostředí hromadí a pozměňují tak stav jednotlivých složek celého ekosystému.¹

Xenobiotika jsou látky, které se v organismu za normálních okolností nevyskytují, nejsou nutné pro jeho zdravý vývoj a neslouží ani jako zdroj energie. Způsob, jakým xenobiotikum do organismu vstupuje, závisí na jeho fyzikálně chemických vlastnostech a na zdroji výskytu. Třemi bezesporu nejdůležitějšími zdroji xenobiotik pro člověka jsou potrava, voda a vzduch. Mezi fyzikálně chemické vlastnosti, které mají vliv na poškození organismu, patří rozpustnost ve vodě, těkavost a reaktivita. Skutečnost, že epitely obsahují ve své struktuře velké množství lipidů, je zodpovědná za usnadnění vstupu do organismu pro lipofilní látky. Obecně vstup xenobiotik do organismu probíhá v několika fázích. Většinou se látka nejprve dostává do krevního řečiště, kde interaguje s plazmatickými proteiny a poté teprve dochází k jejímu vstupu do jednotlivých tělních buněk. Riziko poškození organismu xenobiotikem nezávisí pouze na toxicitě dané sloučeniny, ale také na její koncentraci a době působení.²

Díky svým účinkům mohou být xenobiotika též řazeny mezi látky mutagenní, teratogenní nebo karcinogenní. Karcinogeneze je postupným mnohastupňovým procesem, při kterém dochází ke kumulaci poruch určitých genů DNA a tedy k narušení normální funkce jimi kódovaných proteinů. Existuje pouze malé množství genů, jejichž poruchy jsou pro karcinogenezi významné. Ty jsou označovány jako tzv. "klíčová místa" a jejich počet je odhadován pouze na několik set, což je méně než 0,1% z celého genomu. Za nejzávažnější vědci považují poruchy genů kódujících proteiny, které se podílejí na přenosu signálu, na kontrole exprese genů a kontrole správnosti replikace DNA a chromosomů, na regulaci buněčného cyklu, dělení a diferenciaci buněk a na regulaci mezibuněčné komunikace a přirozené apoptózy poškozených buněk. Vznik určitých poruch v několika kritických genech může vést k maligní transformaci buňky. Čím více je člověk vystavován karcinogenním činitelům, tím větší riziko onkologického onemocnění mu hrozí.³

Nádorová onemocnění jsou v současné době druhou nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích. Podle Národního onkologického registru České republiky u nás průměrně každý den na následky této diagnózy zemře okolo 76 pacientů, tj. ročně přes 27 tisíc osob.³

Sudan I je látkou, která má schopnost vyvolat tvorbu nádorů v játrech a močovém měchýři u experimentálních zvířat, jakými jsou například myš, potkan a králík.⁴ Rakovinnotvorný vliv Sudanu I na lidský organismus nebyl doposud prokázán a řadí se mezi významné předměty současného výzkumu. V rámci působení tohoto azobarviva je *in vivo* zkoumán mimo jiné také vliv Sudanu I na expresi enzymů, které katalyzují reakce jeho metabolismu.^{5, 6}

1.1 Azobarviva

Azobarviva tvoří početnou skupinu chemicky příbuzných látek obsahujících ve své struktuře jednu nebo více částí, ve kterých energetický rozdíl mezi dvěma různými molekulovými orbitaly odpovídá viditelné oblasti spektra. Tyto části se nazývají chromofory a jsou zodpovědné za barvu sloučeniny.⁵ Teoreticky pokrývají azobarviva celé spektrum barev od žlutozelené přes oranžovou, červenou, fialovou, až po hnědou barvu.⁷

Azobarviva obecně tvoří 60 – 70% všech typů chemických barviv. Název “azo” původně pochází z francouzského jazyka, slovo “azote” totiž znamená dusík. Pro azobarviva je charakteristický obsah chromoforické funkční skupiny $-N=N-$, která nese dva sp^2 hybridizované atomy. Ty jsou velmi často součástí aromatických systémů. Většinou barviva obsahují pouze jednu azo skupinu, avšak méně často mohou obsahovat skupiny dvě (disazo), tři (trisazo) či více.⁷

Skupina azobarviv je v průmyslu obecně hojně využívána, a to zejména pro barvení umělých vláken, kůže, textilu, papíru, kosmetických přípravků a potravin. Dále hraje podstatnou roli při výrobě laků, barev a léků.⁸

V poslední době došlo ke znatelné mezinárodní regulaci používání těchto barviv zejména při výrobě léků, kosmetiky, potravin a při balení potravin. V některých státech, např. ve Francii a v Německu, tato omezení platí i pro textilní průmysl. Důvodem je skutečnost, že během jednotlivých fází produkce, výroby a odbytu jsou člověk a životní prostředí vystaveny potenciálně kancerogennímu působení jedné ze složek barviv - aromatickým aminům.⁷

Azobarviva mohou být rozdělena do dvou základních skupin. První z nich je skupina azo pigmentů, kterou tvoří látky ve vodě fakticky nerozpustné a druhou skupinou je vlastní skupina azobarviv, která se ve vodě rozpouští a poté ztrácí svoji krystalickou nebo jinak specifickou strukturu. Organické azo pigmenty se dělí do několika skupin v závislosti na podobnostech v chemické struktuře.⁹

1.1.1 Aromatické aminy

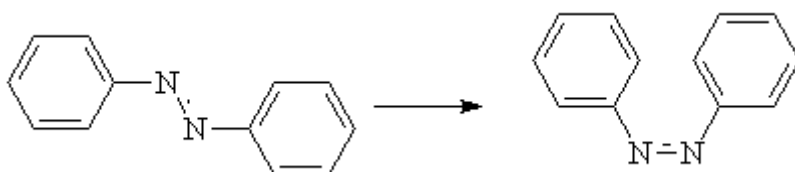
Poté, co se azobarviva dostanou do lidského organismu (inhalace, kožní kontakt nebo požití), jsou primárně metabolizována střevní mikroflórou na bezbarvé aromatické aminy působením NAD(P)H-dependentních azoreduktas nebo sekundárně působením jaterních azoreduktas.¹⁰ Aromatické aminy jsou následně metabolizovány na genotoxické sloučeniny savčími mikrosomálními enzymy.⁸

Aromatické aminy jako kancerogenní součást azobarviv mohou být rozděleny do pěti následujících skupin:⁷

- . aniliny, např. o-toluidin
- . rozvinuté aniliny, např. benzidin
- . sloučené aromatické aminy, např. 2-naftylamin
- . aminoazo- a jiné azosloučeniny, např. 4-(fenylazo)-anilin
- . heterocyklické aminy

1.1.2 Izomerie v azobarvivech

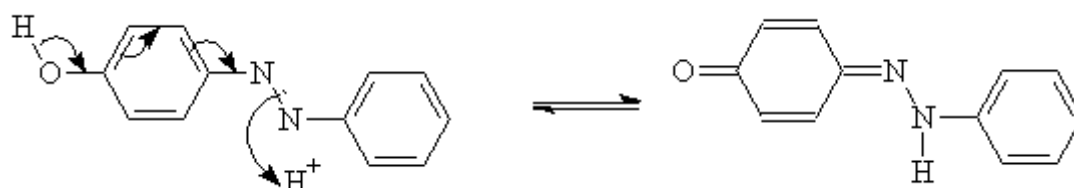
Azobarviva jsou obecně schopna nabývat dvou geometricky izomerních forem. (viz obrázek č. 1)



Obrázek č. 1 – Změna geometrické izomerie azobarviv z *trans* na *cis* působením UV záření (převzato z ¹¹)

Tautomerní formy azobarviv vznikají odebráním atomu vodíku z jedné části molekuly a jeho přidáním do jiné části molekuly (např. viz obrázek č. 2). Tautomerní formy jsou snadno identifikovatelné díky svým charakteristickým spektrům. Ne všechna

azobarviva však tvoří tautomerní formy a některé tautomerní formy jsou stabilnější než jiné.¹¹



Obrázek č. 2 – Dvě tautomerní formy azobarviv
(převzato z ¹¹)

1.1.3 Metabolismus azobarviv

V průběhu metabolismu v organismu jsou azobarviva nejen detoxikována, ale naopak jsou často potencovány i jejich toxické účinky. Azobarviva patří mezi karcinogeny, které pro svůj karcinogenní efekt vyžadují metabolickou aktivaci (produkci reaktivních metabolitů iniciujících poškození DNA tvorbou kovalentních aduktů).¹²

Reakce aktivující azobarviva označovaná podle přítomnosti $-NH_2$ skupin jako aminoazobarviva a jejich reaktivní metabolity jsou již známy. U těchto azobarviv je karcinogenní účinek vyvolán metabolickými změnami probíhajícími právě na aminoskupinách v jejich molekule. *N*-Hydroxylace, sulfatace a rozpad sulfátového konjugátu vedou k tvorbě nitreniových či karbeniových iontů, které kovalentně modifikují DNA a iniciují tak procesy kancerogeneze.¹²

1.1.4 Sudan I

Sudan I, známý též pod názvy *C.I. Solvent Yellow 14*, *Solvent Orange R* nebo *Oil Orange*, se systematicky jmenuje (fenylazo)-2-naftol a řadí se mezi významná azobarviva. Sudan I existuje jako směs tautomerních forem, konkrétně jsou to (Z) azo(fenolická) forma a (Q) chinon(hydrazonová) forma (viz obrázek č. 3).¹³

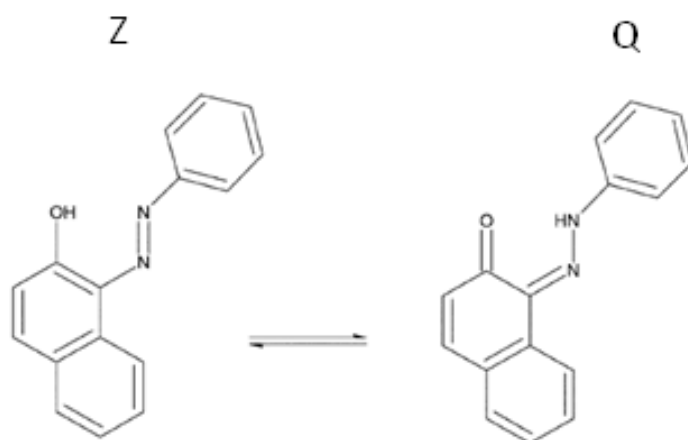
V minulosti byl hojně používán jako potravinářské barvící aditivum, dokud jej Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC, *International Agency for Research of Cancer*) neoznačila za nebezpečný. Je totiž původcem nádorů v játrech nebo močovém měchýři krys, myši a králíků.¹⁴

V roce 1975 byl Sudan I již zmíněnou agenturou pro nedostatek relevantních údajů zařazen do 3. kategorie karcinogenů jako látka, která je neklasifikovatelná jako lidský

karcinogen. Přesto však bylo doporučeno barvivo dále nepoužívat jako aditivum v potravinách. V roce 2001 byl Sudan I pracovní skupinou s názvem Komise pro klasifikaci a označování nebezpečných látek EU označen za lidský kožní alergen. Ačkoliv bylo použití Sudanu I jako aditiva Evropskou unií zakázáno, přesto byly v roce 2003 podány zprávy o přítomnosti Sudanu I ve směsích koření, v palmových olejích a v dalších potravinách. V roce 2005 byla Evropským úřadem pro kontrolu potravin potvrzena údajná genotoxicita a karcinogenita Sudanu I pro lidský organismus.¹⁵

Sudan I je jedním z velmi významných polutantů životního prostředí. Statistiky ukázaly, že v 70. letech bylo v USA každoročně vyprodukováno zhruba 300 t Sudanu I, v Evropě 100 t a v Japonsku 46 t.⁴ Dále bylo zjištěno, že vysoká účinnost Sudanu I jako alergenu vyvolává u lidí a morčat kontaktní dermatitidu. Při styku s kůží způsobuje její zcitlivění (senzitivizaci), která v některých případech přetrvává i měsíce.¹⁶

Přes své negativní účinky na živé organismy je Sudan I dodnes široce používán pro barvení nejrozličnějších materiálů, jako jsou oleje, tuky, vosky, tiskařské inkoustové barvy, benzíny a leštidla na boty a podlahy.⁶



Obrázek č. 3 – Tautomerní formy Sudanu I
(převzato z ¹³)

Metabolismus Sudanu I

Sudan I se od většiny jiných azobarviv odlišuje tím, že ve své molekule neobsahuje aminoskupiny. Skutečnost, že jeho aktivace vychází z naprosto odlišných reakcí, je zřejmě hlavním důvodem, proč je právě toto azobarvivo hojně zkoumáno.

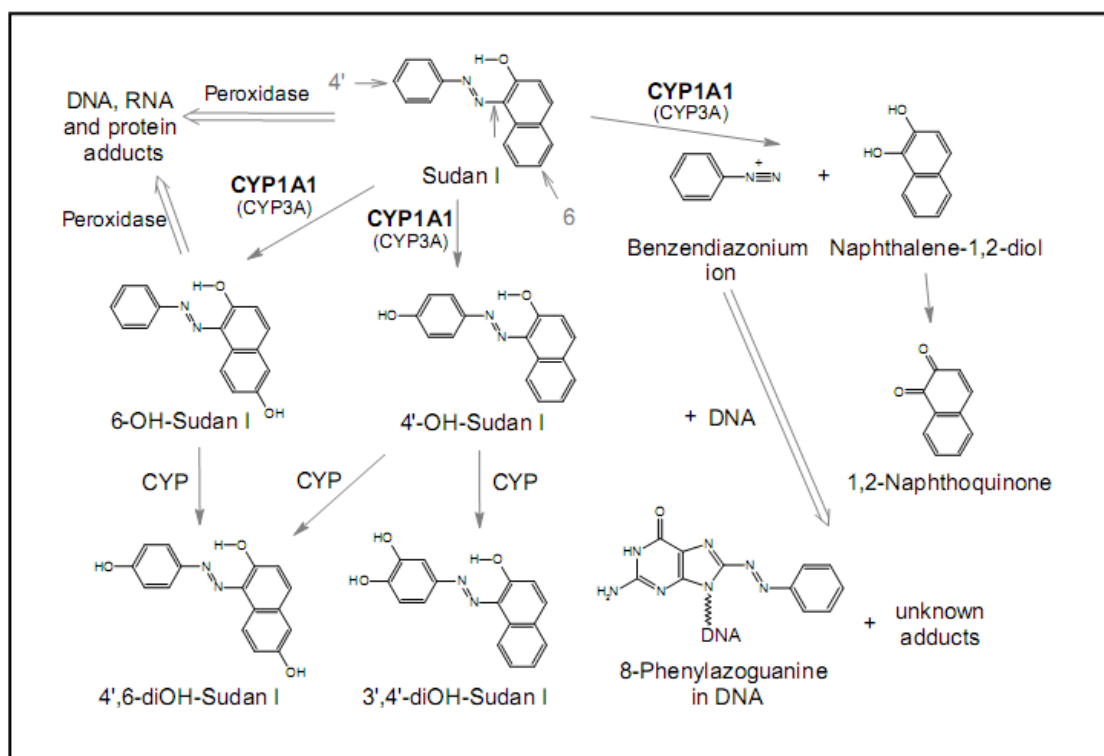
Primárně probíhá metabolismus Sudanu I v játrech. Jedná se zejména o oxidační a redukční reakce (viz. **obrázek č. 4**). Studie na králících a potkanech *in vivo* ukázaly, že oxidační reakce vede majoritně k tvorbě hydroxylovaných metabolitů v poloze 4' benzenového kruhu za vzniku 1-[(4-hydroxyfenyl)azo]-2-naftolu, tedy 4'-OH-Sudan I a v poloze 6 naftalenové části molekuly za vzniku 1-(fenylazo)naftalen-2,6-diolu, tedy 6-OH-Sudan I. Oba metabolity byly detekovány v moči a žluči zvířat vystavených tomuto barvivu, a to ve své původní formě nebo ve spojení s kyselinou glukuronovou či sulfátem. Jejich vyloučení z těla je poměrně snadné, a proto tyto oxidační reakce Sudanu I mohou být považovány za detoxikační. Sudan I však může být *in vivo* metabolizován i redukčními reakcemi, které vedou ke štěpení azoskupiny a tvorbě látek 1-amino-2-naftol, anilin a *para*-amino-fenol. Metabolity jsou opět z těla vylučovány velmi snadno, redukce Sudanu I jsou tedy také reakcemi detoxikačními.¹⁷

Při studiích *in vitro* byly jako minoritní produkty identifikovány tyto dvě sloučeniny: 1-[(3,4-dihydroxyfenyl)azo]-2-naftol, tedy 3',4'-di(OH)-Sudan I a 1-[(4-hydroxyfenyl)azo]naftalen-2,6-diol, tedy 4',6- di(OH)-Sudan I. Dále byl identifikován též produkt oxidačního štěpení azoskupiny Sudanu I, benzendiazoniový ion.¹⁸ Pomocí techniky “³²P-postlabeling“ bylo zjištěno, že tento ion reaguje se zbytky guaninu v DNA za vzniku stabilního aduktu 8-(fenylazo)guaninu, který může být zodpovědný za iniciaci kancerogeneze v játrech vyvolané azobarvivem Sudanem I (byl nalezen v DNA jater potkanů vystavených působení Sudanu I).^{19, 20} Tyto oxidační reakce Sudanu I *in vitro* jsou katalyzovány mikrosomálními subcelulárními systémy jater laboratorního potkana obsahujícími cytochromy P450.²¹

Pozdější výzkum ukázal, že adukty nalezené v DNA močového měchýře laboratorních potkanů exponovaných Sudanu I neodpovídají 8-(fenylazo)guaninovému aduktu, který byl nalezen po aktivaci Sudanu I cytochromy P450. V tomto dalším cílovém orgánu jsou tedy za iniciaci kancerogeneze zodpovědné jiné metabolity než benzendiazoniový ion. Adukty Sudanu I v DNA močového měchýře vznikají jednoelektronovými (radikálovými) oxidacemi Sudanu I a jeho derivátů peroxidasami (primárně je tvořen naftoxyradikál Sudanu I).²¹

V průběhu oxidací katalyzovaných oběma enzymovými systémy dochází k aktivaci Sudanu I na reaktivní metabolity, které mají schopnost kovalentně se vázat na nukleové kyseliny (DNA, tRNA), polydeoxyribonukleotidy a proteiny.¹²

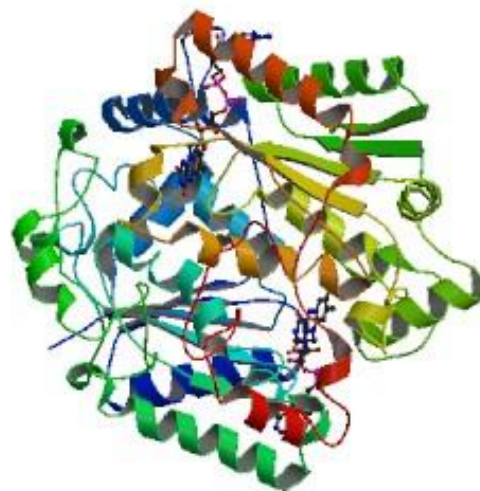
Redukční reakce participují na biotransformaci xenobiotika Sudanu I v menší míře než reakce oxidační. S tím souvisí i skutečnost, že rovněž enzymy katalyzující redukční reakce jsou daleko méně charakterizovány. Jejich identifikace a charakterizace však nabývají v poslední době na významu. Jedním z těchto enzymů je cytoplazmatický enzym DT-diaforasa [NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa], který vedle své hlavní funkce - redukce chinonů - je schopen redukovat rovněž nízkomolekulární xenobiotika, jakým je azobarvivo Sudan I.¹



Obrázek č. 4 – Schéma metabolismu Sudanu I (převzato z²²)

1.2 DT-diaforasa (NQO1)

Enzym NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1 (DT-diaforasa, NQO1) je důležitou součástí chemoprotekce se schopností snižovat toxicitu jedovatých látek a jejich metabolitů v tělech organismů.²³ Tento enzym patří do skupiny flavoproteinů. Katalyzuje redukce širokého spektra sloučenin, mezi něž se řadí zejména chinony, chinoniminy, naftochinony a azo- a nitro- sloučeniny.²⁴ Metabolismus NQO1 tedy není omezen pouze na chinony, enzym funguje i jako nitroreduktasa se substráty, jakými jsou například dinitropyreny a nitrobenzamidy.²⁵



Obrázek č. 5 – Krystalická struktura lidské NAD(P)H:chinon oxidoreduktasy (převzato z ²⁶)

NQO1 je dvouelektronová reduktasa, která je schopna používat jak NADH, tak i NADPH jako kofaktory při redukčních reakcích. Název enzymu byl odvozen právě z této jeho specifické vlastnosti. Primárně je DT-diaforasa cytoplazmatickým enzymem v eukaryotních organismech (> 90%) a existuje jako homodimer, který má v každém aktivním centru jednu prosthetickou skupinu FAD. Obě identické podjednotky jsou v “head-to-tail” uspořádání a každé aktivní centrum je tvořeno částí jedné i druhé podjednotky.^{27, 1}

U savců je enzym přítomný ve většině orgánů a jeho největší množství bylo detekováno v játrech. V lidském těle je jeho aktivita signifikantně vyšší zejména ve více prokrvených tkáních. Exprese genu NQO1 je indukována působením různých xenobiotik, oxidantů, antioxidantů, UV záření a ionizujícího záření.²⁸

DT-diaforasa byla objevena v laboratoři profesora Emstera a první zmínky o tomto objevu byly publikovány v roce 1958. Enzym byl detekován úplnou náhodou během studií NAD- a NADP-dependentních dehydrogenas. Dodnes vzbuzuje obrovský zájem, protože svou účastí v detoxifikaci xenobiotik velkou měrou přispívá k ochraně proti mutagenitě, karcinogenitě a jiným toxickým účinkům způsobených chinony a jejich metabolickými prekurzory. Nedávné výzkumy poukázaly na schopnost DT-diaforasy generovat

antioxidační formy ubiquinonu a vitamínu E. Tato skutečnost dokazuje, že je NQO1 součástí tělesného antioxidačního systému.^{29, 30}

1.2.1 Katalytický cyklus enzymu

Studia krystalické struktury potvrdila, že NQO1 funguje “ping-pongovým mechanismem“, při kterém redukované pyridinové nukleotidy redukují flavinový kofaktor a oxidovaný pyridinový nukleotid je následně uvolněn, aby se mohl vázat substrát. Redukce chinonu na hydrochinon je jednokroková reakce, při které nevznikají semichinonové radikálové intermediáty. Skutečnost, že se v případě tohoto enzymu jedná právě o zmíněný mechanismus, potvrdily ESR experimenty. Mechanismus katalýzy tedy zřejmě obsahuje přesmyk vodíku mezi NADH a FAD kofaktory a poté z FADH₂ k chinonovému substrátu.³¹

Použitím heterodimerů NQO1 vědci zjistili, že podjednotky enzymu NQO1 fungují nezávisle na sobě při metabolismu dvouelektronových redukčních reakcí, a naopak závisle na sobě při čtyřelektronových redukcích azobarviv a nitrosloučenin.³²

1.2.2 Detoxifikační reakce katalyzované DT-diaforasou

O chinonech je všeobecně známo, že jsou cytotoxické kvůli své schopnosti účastnit se oxidačně-redukčních cyklů. Jsou široce zastoupeny v přírodě, tudíž je jim lidský organismus vystaven ve velké míře. Chinony na bázi polycyklických aromatických uhlovodíků jsou ve velkém množství obsaženy v pálených organických materiálech, jako jsou například automobilové výpary, cigaretový kouř a velmi často jsou dokonce chinony součástí potravin.³³

Početné studie poukazují na důležitou roli NQO1 při detoxifikaci chinonů. V případě menadionu (vitamin K₃) dvouelektronová redukce katalyzovaná enzymem NQO1 přímo soutěží s jednoelektronovými buněčnými reduktasami (viz **obrázek č. 6**). Při dvouelektronové redukci menadionu vzniká stabilní hydrochinon, který pomáhá chránit buněčné membrány proti oxidativnímu poškození, může být snadno konjugován a z těla vyloučen. Naopak při jednoelektronové redukci vzniká semichinon, který v přítomnosti redoxních cyklů obsahujících kyslík tvoří reaktivní kyslíkaté sloučeniny. Tuto hypotézu potvrzují i výsledky výzkumu u myší, u kterých porucha v NQO1 vedla ke zvýšení toxicity menadionu.³⁴

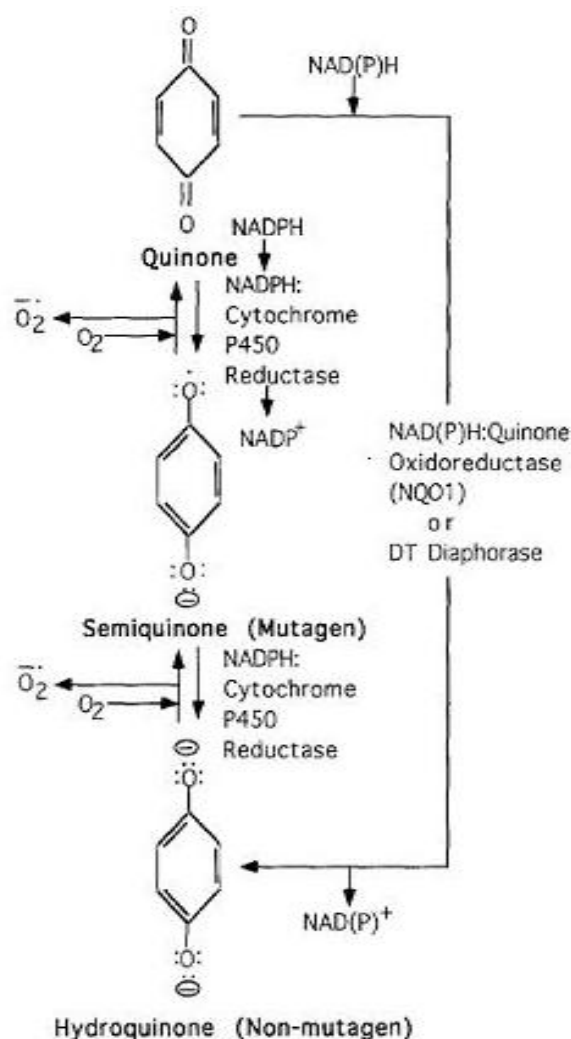
Experimenty prokázaly, že enzym NQO1 v krysích játrech může katalyzovat redukci ubichinonových analogů, např. koenzymu Q, na jejich ubichinolové formy v liposomech a krysích hepatocytech. Rychlost redukce derivátů koenzymu Q závisí na délce uhlíkatého řetězce. Homology s kratším řetězcem byly redukovány efektivněji. Ubichinol tvořený redukcí katalyzovanou enzymem NQO1 je efektivním antioxidantem, který chrání membránové fosfolipidy proti oxidativnímu stresu.³⁵

Produktem oxidace α -tokoferolu (vitamin E) je α -tokoferolchinon. Ten nabývá antioxidantních účinků, pokud dojde k jeho redukci na α -tokoferolhydrochinon. Experimenty s purifikovanou lidskou NQO1 ukázaly, že tato redukce je velice efektivně katalyzována také právě tímto enzymem.³⁵

O enzymu NQO1 je však též známo, že může aktivovat cytotoxické sloučeniny a některé prokarcinogeny, jako například nitroaromatické sloučeniny a heterocyklické aminy.³⁰ Díky duální schopnosti NQO1 detoxifikovat a na druhé straně bioaktivovat xenobiotika je přesná role enzymu v karcinogenezi nejistá.^{33, 36}

1.2.3 Exprese genu pro NQO1

Gen pro NQO1 je obecně exprimován prakticky ve všech tkáních, vědci však mezi mírou exprese v různých z nich našli obrovské rozdíly.^{37, 38} Doposud byla potvrzena exprese proteinu NQO1 v mnoha tkáních vyžadujících vysokou míru antioxidantní ochrany. Patří mezi ně epitelální buňky plic, střev, cévního endotelu, dále epitelální buňky ro-



Obrázek č. 6 – Dvouelektronová redukce versus jednoelektronová redukce chinonů a jejich derivátů (převzato z ³²)

hovky, čočky a sítnice, optického nervu a nervových fibrií. Vědci se domnívají, že vysoká množství NQO1 znamenají, že se enzym v buňkách dané tkáně chová primárně jako “sloučenina s antioxidačními účinky”.³⁹

Několik studií zjistilo, že aktivita NQO1 je vyšší v tumorových buňkách ve srovnání se zdravými buňkami stejného původu. Vysoké hladiny enzymatické aktivity byly zjištěny ve zhoubných nádorech jater u krys, myši i lidí.³⁸ Velmi vysoká exprese NQO1 byla potvrzena v lidských nádorech střev a v intersticiálních buňkách tumorů krysích varlat.⁴⁰ Signifikantně vyšší množství enzymu byla naměřena v nádorech prsu a prsních žláz u žen.⁴¹ Schlager a Powis popsali, že zvýšená množství enzymu NQO1 jsou také v tumorech plic a střev.⁴² 20% až 50% nárůst NQO1 mRNA v tumoru lidských jater oproti normálním jedincům zaznamenali Cresteil a Jaiswal.⁴³

Schlager a Powis se zabývali ve svých studiích také rozdíly v aktivitě NQO1 indukované kouřením a alkoholem u lidí. Nekuřáci mají znatelně vyšší aktivitu enzymu v nádorových buňkách oproti zdravým buňkám. Enzymová aktivita u kuřáků je v tumorech a zdravých tkáních prakticky stejná. Alkohol obecně vede ke zvýšení enzymové aktivity v plicním tumoru, avšak nemá žádný vliv na enzym NQO1 ve zdravých plicích. Je více než zřejmé, že exprese genu NQO1 je a v budoucnu jistě zůstane předmětem zkoumání.⁴²

1.2.4 Polymorfismus NQO1

Role NQO1 v chemoprotekci je evidentně klíčová vzhledem k četnému výskytu nemocí a xenobiotiky indukované toxicitě u jedinců, kteří mají polymorfni NQO1. Jedná se o homozygotickou změnu C - T v pozici 609 komplementární DNA, která kóduje výměnu prolin-serin v aminokyselinové sekvenci enzymu. Homozygotická změna C609T vede buď k nedetekovatelnému, nebo přinejlepším ke stopovému množství mutantního NQO1 proteinu a nedostatku aktivity NQO1. Protože homozygotická změna v pozici 609 poskytuje prakticky nulový fenotyp, je výhodným molekulárním nástrojem pro posuzování role enzymu NQO1 *in vivo*. Tento polymorfismus byl spojován s rostoucím nebezpečím tumorů močových cest, myeloidních leukémií, kožních bazocelulárních karcinomů, pediatrických leukémií a stejně tak i se zvýšenou benzenem indukovanou krvetvornou toxicitou. Studie ukázaly, že mutantní gen NQO1 by naopak neměl způsobovat rakovinu prostaty. Vliv polymorfismu enzymu na jiné formy rakoviny je v současnosti předmětem výzkumu.³⁹

1.3 Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR)

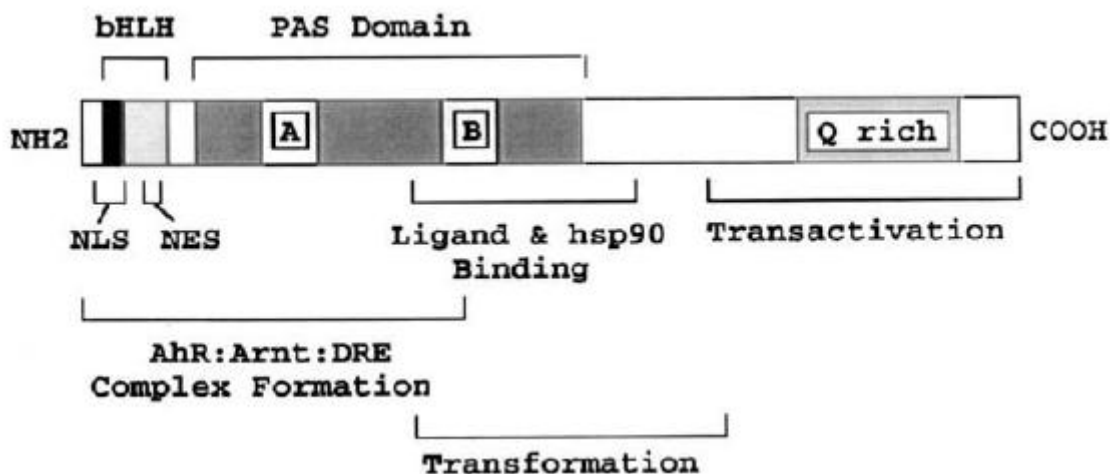
Receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR) je tvořen 848 aminokyselinami a jeho teoretická molekulová hmotnost je 96 kDa.^{44,45} AhR, k jehož aktivaci dochází prostřednictvím ligandu, patří do rodiny bazických “helix-loop-helix Per-Arnt-Sim“ (bHLH-PAS) transkripčních faktorů. Je součástí systému zodpovědného za biologické odpovědi na halogenované aromatické sloučeniny, polycyklické aromatické uhlovodíky, flavonoidy a mnoho dalších sloučenin.⁴⁶ Tento receptor je exprimován ve většině orgánů a buněk v těle a jeho hlavní funkcí je kontrola exprese genů kódujících enzymy první fáze metabolismu xenobiotik, jako např. enzymy podrodiny CYP1A a enzym NAD(P)H: chinon oxidoreduktasu (NQO1), avšak také enzymy druhé fáze tohoto metabolismu, kterými jsou např. glutathion-S-transferasa A1 (GSTA1) a UDP-glukoronosyltransferasy (UGT).⁴⁷

Ah receptor byl poprvé identifikován v játrech u myši v roce 1976 v Polsku při pokusech s 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinem (TCDD).⁴⁸ Tento vysoce jedovatý přírodní toxikant, který je meziproduktem při průmyslových procesech a spalování organických materiálů, se vázal specificky na receptor, prostřednictvím kterého indukoval enzymy katalyzující reakce první i druhé fáze biotransformace a upravoval expresi velkého množství genů. Mechanismus signální dráhy byl později objasňován na modelu indukce CYP1A1.⁴⁹ AhR má velké množství rozdílných ligandů exogenní i endogenní povahy.⁵⁰ Ačkoliv byly doposud identifikovány desítky xenobiotických ligandů a biologických sloučenin, které s AhR interagují, přesto je AhR považován za tzv. sirotčí receptor (“orphan receptor“). Důvodem je skutečnost, že jeho fyziologický ligand a jeho vlastnosti nejsou doposud známy.⁵¹

1.3.1 Struktura Ah receptoru

AhR dimerizuje se strukturně velmi podobným proteinem ARNT (“AhR nuclear translocator“) a tento komplex reguluje transkripci různých enzymů metabolizujících xenobiotika. Oba receptory jsou řazeny mezi členy rodiny “basic helix-loop-helix Per-Arnt-Sim“ (bHLH-PAS) transkripčních faktorů. Ah receptor je jako jediný člen aktivován ligandem.⁵²

Receptor AhR obsahuje tři hlavní domény (viz **obrázek č. 7**).⁵³



Obrázek č. 7 – Funkční domény myšního AhR. Bližší popis v textu. (převzato z ⁵⁴)

bHLH doména je umístěna v blízkosti N-konce. Zodpovídá za dimerizaci, vazbu molekulového chaperonu Hsp90 a vazbu k DNA. Součástí této domény je mimo jiné sekvence NLS (“nuclear localization signal”), která společně se sekvencí NES (“nuclear export signal“) obsaženou v bHLH a PAS doméně umožňuje vstup AhR do jádra při aktivaci receptoru.

PAS doména je oblast obsahující přibližně 250 aminokyselin, která je lokalizována v blízkosti C konce bHLH domény. Zodpovídá za vazbu ligandu, molekulového chaperonu Hsp90 a dimerizaci. Doména je složena ze dvou opakujících se úseků PAS A a PAS B, které jsou vysoce evolučně konzervovány. Tyto úseky od sebe odděluje málo konzervovaný úsek asi 150 aminokyselin.

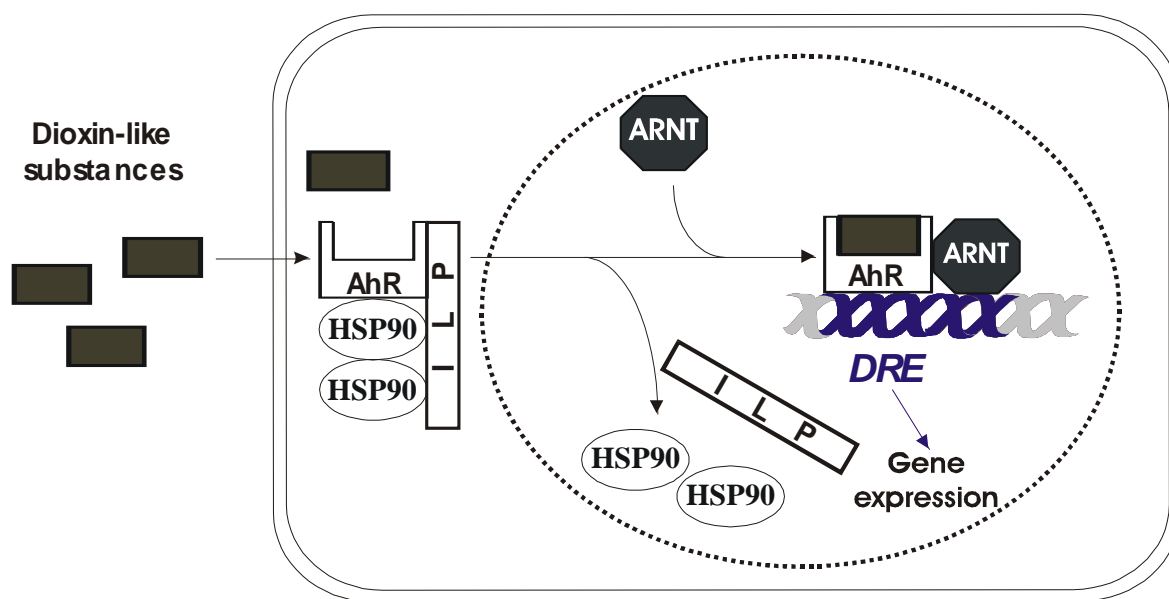
C-terminální doména zodpovídá za transkripční aktivitu. Tato doména je velmi bohatá na glutamin.⁵⁵

1.3.2 Mechanismus aktivace Ah receptoru

Neaktivovaný receptor AhR (viz **obrázek č. 8**) se nachází v cytoplazmě asociovaný se dvěma proteiny indukovanými teplem o molekulové hmotnosti 90 kDa, tj. chaperony Hsp90 (“heat shock proteins“) a dále s proteiny, které jsou podobné imunofilinu (ILP, “immunophilin-like proteins“), tj. protein p23 a protein XAP₂ (často také označovaný jako ARA9 či AIP).⁵⁶ Poté, co se ligand (např. TCDD) naváže na PAS doménu, dojde v receptoru ke konformační změně. Takto aktivovaný Ah receptor opustí multiproteinový komplex a přesune se do jádra. V jádře AhR vytvoří heterodimer s proteinem ARNT. Komplex AhR-ARNT se následně váže s vysokou afinitou na specifickou oblast DNA -

na tzv. dioxin-responzivní element (DRE, “dioxin response element“ - nukleotidová sekvence 5'-TNGCGTG-3'). DRE reguluje expresi přilehlých genů, negativně i pozitivně.^{57, 47}

Bylo zjištěno, že význam ARNT v rámci této signalizační dráhy netkví pouze v partnerství s AhR, které je nezbytné pro vazbu na DNA. ARNT má zřejmě také nepostradatelnou roli při disociaci cytoplazmatických chaperonů.^{47, 58}



Obrázek č. 8 - Mechanismus signální dráhy spuštěné aktivací Ah receptoru. Bližší popis v textu. (převzato z⁵⁸)

1.3.3 Regulace AhR - signální dráhy

Aktivita Ah receptoru je regulována několika způsoby:⁵⁹

- *Aktivace prostřednictvím ligandu* - Ligandy exogenní povahy vázající se na AhR jsou typicky hydrofobní, planární nebo koplanární molekuly s polycyklickou strukturou (TCDD, 3-methylcholanthren, benzo[a]pyren, β-naftoflavon). Ah receptor mohou aktivovat také nepolycyklické a neplanární sloučeniny (karotenoidy, omeprazol, tiabendazol), které však mají vazebnou aktivitu k Ah receptoru velmi slabou.^{59, 60}
- *Degradace receptoru* - AhR protein je degradován v důsledku expozice ligandu a následného exportu z jádra. Degradací proces je ovlivňován proteasom-

ubiquitinovým systémem a jeho intenzita se liší v různých typech buněk. Po navázání TCDD na AhR je koncentrace AhR v jádře nejvyšší možná a následuje prudký pokles spojený s počátkem degradačního procesu. Jaderný lokalizační signál (NLS) je u neaktivního AhR maskován chaperonovými proteiny a proto je AhR zadržován v cytoplazmě. Sekvence jaderného exportního signálu (NES) je důležitá pro odstranění receptoru z jádra.^{59, 61}

- . *Interakce s proteiny* – Negativně je transkripční aktivita AhR modulována tzv. AhR-represorem (AhRR). Ten se také řadí do “HLH PAS“ superrodiny proteinů a ve své struktuře se velmi podobá proteinům AhR a ARNT.⁶² AhR represor může být exprimován konstitutivně (srdce, mozek) i inducibilně (plíce, mozek).⁴⁷ Obecně platí, že se AhR represor nachází v jádře a není schopen vázat TCDD. AhRR tvoří navázáním na ARNT heterodimer (AhRR/ARNT), ten je ale transkripčně neaktivní. Exprese AhRR je řízena Ah receptorem tzv. negativní zpětnovazebnou regulací.^{59, 61}
- . *Fosforylace* – Fosforylace je nástrojem regulace vazebné aktivity AhR/ARNT heterodimeru. Oba proteiny, tj. AhR a ARNT jsou fosforylovány na threoninových zbytcích. Fosforylace AhR je katalyzována enzymem proteinkinasa C a dochází k ní v C-koncové části receptoru.^{59, 60, 63}

2 Cíl bakalářské práce

- . Izolace celkové RNA z jednotlivých orgánů potkanů, jimž byl podáván Sudan I
- . Převedení RNA za pomoci reverzní transkripce na cDNA s využitím náhodných hexamerů jako primerů
- . Určení obsahu mRNA pro enzym NQO1 v orgánech potkanů, jimž byl podáván Sudan I, relativně vůči kontrolnímu genu (β -aktin)
- . Konfrontace získaných výsledků se stanovením relativního množství mRNA pro sledovaný enzym v orgánech potkanů, kterým nebyl podáván Sudan I

3 Experimentální část

3.1 Použitý materiál a chemikálie

▪ Applied Biosystem (USA)	TaqMan® Universal PCR Master Mix (No AmpErase® UNG) TaqMan Gene Expression Assay Rn00667869_m1/Rn00566528_m1 (specifické pro potkaní gen pro β -aktin/NQO1)
▪ Bio Basic Inc. (Kanada)	Tris (Base) [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] kyselina boritá
▪ British Drug Houses (UK)	Sudan I
▪ Fermentas (Kanada)	RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, DNA marker (λ DNA EcoRI + HindIII)
▪ Invitrogen (USA)	Trizol® Reagent, SYBR® Green II RNA Gel Stain
▪ Lachema (ČR)	Ethanol
▪ Lech-Ner (ČR)	Isopropanol
▪ Linde (Německo)	Kapalný dusík
▪ Penta (ČR)	Chloroform
▪ Top-Bio (ČR)	PCR Ultra H ₂ O, PCR agarosa, PCR vkládací pufr

Poznámka: Orgány potkanů pro tuto práci dodala Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

3.2 Použité metody

3.2.1 Premedikace potkanů

Potkanům z kmene Wistar bylo podáváno intraperitoneálně azobarvivo Sudan I, které bylo rozpuštěno v kukuřičném oleji (dávka: 20 mg/kg váhy jednou denně po dobu tří dnů). Po uplynutí jednoho dne od posledního podání byl potkanům zlomen vaz a byly z nich vyjmuty orgány, které byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy do mrazicího boxu (-80 °C).⁶⁴

3.2.2 Izolace celkové RNA

Obecný úvod:

Izolace vysoce kvalitní, čisté a nekontaminované celkové RNA je podstatným krokem mnoha základních experimentů v molekulární biologii. TRIZOL® Reagent patří do skupiny činidel, které jsou vhodné pro izolaci celkové RNA z různých tkání a typů buněk včetně těch, které jsou bohaté na lipidovou složku.⁶⁵ Jedná se o monofázní roztok složený z fenolu a guanidin-isothiokyanátu. TRIZOL® Reagent zachovává v homogenizovaném vzorku integritu RNA, narušuje buňky a solubilizuje buněčné komponenty.⁶⁶

Poznámka:

Po celou dobu izolace jsem používala rukavice bez prášku. Postup jsem prováděla v biohazard boxu, abych zabránila kontaminaci, a s použitím chladicího stojánku, abych zabránila degradaci RNA.

Příprava:

Mikrozkumavky Eppendorf, špachtle a pinzety jsem sterilizovala po dobu 6 hodin při teplotě 130 °C. Špičky s filtrem jsem autoklávovala po dobu 20 minut při teplotě 121 °C. Ethanol a isopropanol jsem uchovávala v mrazícím boxu (-20 °C), Trizol® Reagent v lednici a chloroform při laboratorní teplotě.

Vlastní postup:

Provedla jsem homogenizaci tkáně v třecí misce s tloučkem s použitím kapalného dusíku. Po převedení vytvořeného prášku do 1 ml Trizolu (hmotnost homogenizovaného vzorku neměla překročit 10 % hmotnosti použitého Trizolu) jsem vzorek inkubovala po dobu 5 minut při laboratorní teplotě, aby došlo k disociaci RNA z nukleoproteinových

komplexů. Přidala jsem 200 μ l chloroformu a extrahovala pomocí Vortexu po dobu 15 sekund. Vzorek jsem znovu inkubovala po dobu 3 minut při laboratorní teplotě a poté jsem jej odstředila v centrifuze 5415 R (Eppendorf) při 12.000 RPM, tj. 13.000 g, po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Odebrala jsem horní bezbarvou vodnou fázi do nové mikrozkušavky a přidala jsem 0,5 ml isopropanolu. RNA ze vzorku jsem ponechala srážet v lednici po dobu 10 minut a poté centrifugovala při 13.000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Odstranila jsem supernatant automatickou pipetou, peletu jsem promyla 1 ml 75 % ethanolu, promísila poklepáním na stěnu mikrozkušavky a centrifugovala při 7.400 RPM (tj. 5.600 g) po dobu 5 minut při teplotě 4 °C. Odebrala jsem ethanol, peletu jsem sušila po dobu několika minut při teplotě 55 °C a poté jsem přidala 70 μ l PCR Ultra H₂O. Vzorek jsem protřepala v ruce a na 3 minuty jsem jej umístila do ohřívače bloků VLM LS (nastaveno na 55 °C), aby došlo k rozpuštění RNA. Vzorky jsem rozdělila na alikvoty a uskladnila jsem je v mrazícím boxu (-80 °C).

3.2.3 Horizontální elektroforéza na agarosovém gelu

Obecný úvod:

Gelová elektroforéza je jedna z nejdůležitějších technik používaných pro frakcionaci RNA, která jako polyaniont migruje v elektrickém poli proti kladné elektrodě. Pohyblivost RNA je přímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti, tzn. nejmenší molekuly urazí největší vzdálenost.⁶⁷

Vlastní postup:

Připravila jsem 50 ml 1% agarosového gelu, tj. 0,5 g agarosy na 50 ml 1xTBE pufru (zásobní pufr 10x koncentrován, pH 8; 0,89M Tris, 0,89M kyselina boritá, 0,02M EDTA). Směs v Erlenmayerově baňce jsem umístila do mikrovlnné trouby a zahřívala jsem ji tak dlouho, dokud nedošlo k rozpuštění agarosy. Po ochlazení jsem gel opatrně přelila do elektroforetické vaničky, vložila jsem do něj hřeben pro vytvoření jamek a vše nechala 30 minut stát. Po ztuhnutí gelu jsem hřeben odstranila a vaničku jsem umístila do elektroforetické aparatury Uvitec, kterou jsem naplnila elektrodoým 1xTBE pufrem.

Vizualizace RNA:

Gel jsem po skončení elektroforézy umístila do barvicí lázně, která obsahovala 50 ml 0,5xTBE pufru s 5 μ l SYBR[®] Green II RNA gel stain. Nechala jsem gel třepat ve

tmě po dobu třiceti minut a poté jsem pomocí transiluminátoru Dark Reader vizualizovala RNA.

3.2.4 Určení koncentrace a čistoty RNA

Obecný úvod:

Podíl absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm (poměr A_{260}/A_{280}) je často používán pro zhodnocení čistoty RNA a DNA vzorků.⁶⁸ Toto zhodnocení poukazuje na kontaminanty obsažené v roztoku, které absorbují v UV spektru, jako jsou například proteiny. Ačkoliv je podíl absorbancí ovlivněn pH,⁶⁹ tuto skutečnost jsem při práci neuvažovala.

Vlastní postup:

Vzorek izolované celkové RNA o objemu 7 μ l jsem doplnila MQ vodou na celkový objem 500 ml a proměřila jsem absorpční spektrum na spektrofotometru E8453 (Hewlett Packard) v rozsahu 220 nm – 340 nm s použitím křemenných kyvet. Jako referenční vzorek jsem použila MQ vodu. Do výpočtu byla zahrnuta korekce na pozadí (zákal, apod.) A_{320} .

Koncentraci RNA [μ g. μ l⁻¹] jsem zjistila dle vzorce: $c = (A_{260} - A_{320}) \times \text{ředění} \times 0,04$

Čistotu jsem spočítala dle vzorce: $\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$

3.2.5 Reverzní transkripce

Obecný úvod:

Principem metody reverzní transkripce je přepis RNA do cDNA. To umožňují retrovirové reverzní transkriptasy, například enzymy izolované z viru ptačí myeloblastózy (AMV-RT) nebo z Moloneyova myšího leukemického viru (MMLV-RT).⁷⁰ Reverzní transkripce byla provedena za použití RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kitu.

Poznámka:

Po celou dobu práce jsem používala rukavice bez prášku. Postup jsem prováděla v biohazard boxu, abych zabránila kontaminaci, a s použitím chladicího stojánku, abych zabránila degradaci RNA.

Příprava:

Mikrozkumavky Eppendorf a pinzety jsem sterilizovala po dobu 6 hodin při teplotě 130 °C. Špičky s filtrem jsem autoklávovala po dobu 20 minut při teplotě 121 °C.

Vlastní postup:

Do PCR mikrozkumavek jsem aplikovala 1 µl náhodných hexamerů ze zásobního roztoku o koncentraci 0,2 µg/µl a množství vzorku odpovídající 1 µg (příp. 3 µg) RNA. Objem jsem doplnila na 14 µl MQ vodou. Připravila jsem kontrolu, která neobsahovala vzorek RNA. Všechny vzorky jsem promíchala poklepáním na stěnu mikrozkumavky a po odstředění na ruční centrifuze jsem je ponechala inkubovat po dobu 5 minut při teplotě 70 °C v Thermocycleru TECHNE, aby došlo k rozvolnění sekundárních struktur v RNA. Vzorky jsem zchladila na ledu, stočila a přidala jsem k nim 7 µl předem připravené směsi (směs obsahovala na jeden vzorek 4 µl 5x koncentrovaného pufru, 2 µl 10 mM dNTP a 1 µl inhibitoru RNas o koncentraci 20 µg/µl). Vzorky jsem promíchala, stočila, inkubovala po dobu 5 minut při teplotě 25 °C, ochladila na ledu a poté opět odstředila. Z každé mikrozkumavky jsem odebrala 2 µl do čisté mikrozkumavky. Připravila jsem tak negativní kontrolu bez reverzní transkriptasy. Do původních mikrozkumavek jsem přidala 1 µl reverzní transkriptasy o koncentraci 200 µg/µl. Všechny mikrozkumavky se vzorky, kontrolou i negativními kontrolami jsem umístila do Thermocycleru TECHNE. Nastavila jsem tyto reakční podmínky:

- . 10 minut při teplotě 5 °C pro nasednutí náhodných hexamerů
- . 42 minut při teplotě 42 °C pro prodlužování cDNA
- . 10 minut při teplotě 70 °C pro deaktivaci reverzní transkriptasy

Takto připravenou cDNA jsem uskladnila v mrazicím boxu (-80 °C).

3.2.6 “Real-time“ polymerasová řetězová reakce

Obecný úvod:

“Real-time“ PCR je jednou z nejdůležitějších metod, které kvantifikují genovou expresi. DNA polymerasa AmpliTaq Gold je enzym, který je relativně teplotně stabilní. Vykazuje nukleasovou aktivitu 5' - 3' a naopak postrádá exonukleasovou aktivitu 3' - 5'. TaqMan sonda je ve skutečnosti oligonukleotid, který má na 5' konci fluorescenční barvivo (FAM™) a na 3' konci zhášecí barvivo (NFQ™). Tyto dva prvky sondy se nacházejí poměrně blízko u sebe, a proto je fluorescence barviva FAM™ vázaného

v sondě potlačena. Pokud však při reakci DNA polymerasa začne štěpit 5' konec sondy, která hybridizovala s úsekem DNA nebo RNA ve vzorku, způsobí tím uvolnění fluorescenčního barviva. Nárůst fluorescence je tedy detekován pouze v případě, že je sonda komplementární s hledanou sekvencí.⁷¹ V našem případě TaqMan sonda pro NQO1 i β -aktin nasedala přes dva exony, aby nedošlo k detekci případné genomové DNA.

Obecně u této metody platí, že čím větší množství cílových sekvencí je obsaženo v původním materiálu, tím rychlejší a signifikantnější bude vzrůst ve fluorescenčním signálu.⁷²

Vlastní postup:

Připravené vzorky cDNA a kontroly bez reverzní transkriptasy jsem 10x zředila MQ vodou. Odebrala jsem vždy 5 μ l, které jsem aplikovala do sterilních PCR mikrozkušavek (pro každý vzorek tkáně dvě paralelní stanovení). Ke každému vzorku v PCR zkumavce jsem přidala 15 μ l předem připravené směsi (směs obsahovala na jeden vzorek 4 μ l MQ vody, 1 μ l TaqMan Gene Expression Assay -specifické pro enzym NQO1/ β -aktin a 10 μ l TaqMan[®] Universal PCR Master Mix). Vzorky jsem umístila do přístroje Rotor Gene 2000 a nastavila jsem tyto reakční podmínky (pomocí programu Rotor Gene 5):

- . 2 minuty při teplotě 50 °C pro nasednutí primerů a sond
- . 10 minut při teplotě 95 °C pro aktivaci DNA polymerasy

Následovalo 50 cyklů o níže uvedených parametrech:

- . 15 sekund při teplotě 95 °C pro rozvolnění DNA
- . 60 sekund při teplotě 60 °C pro hybridizaci sond a prodlužování DNA

Poznámka:

Pro kvantifikaci exprese genu NQO1 byly odebrány vzorky tkáně ze tří jedinců. Celkem jsem tedy pracovala se třemi vzorky každé tkáně, pro každý vzorek byla provedena dvě paralelní stanovení.

Výsledná data jsem vyhodnocovala v programu Rotor Gene 5. Nalezla jsem hodnoty C_T (cross threshold) pro každý vzorek tkáně, tj. číslo cyklu, ve kterém křivky pro obě paralelní stanovení protínají linii (threshold) se signifikantním nárůstem detekce signálu, a hodnoty jsem statisticky zpracovala.

Statistický výpočet pro každou analyzovanou tkáň:

- . Výpočet aritmetického průměru ze dvou hodnot C_T určených pro jeden vzorek (paralelní stanovení), který vyjadřuje expresi daného genu v daném vzorku tkáně.
- . Stanovení relativní hodnoty ΔC_T , která vyjadřuje expresi sledovaného enzymu v porovnání s referenčním genem v daném vzorku tkáně, odečtením hodnoty průměru C_T referenčního genu od hodnoty průměru C_T sledovaného enzymu dle vzorce:

$$\Delta C_T = C_T(NQO1) - C_T(\beta\text{-aktin})$$

- . Výpočet průměrné hodnoty $\overline{\Delta C_T}$ a směrodatné odchylky, které charakterizují průměrnou relativní expresi sledovaného genu v dané tkáni a získají se jako aritmetický průměr hodnot ΔC_T pro 3 zvířata.
- . Vyjádření míry indukce exprese genu NQO1 ve vzorcích dané tkáně odebrané z potkanů premedikovaných Sudanem I oproti tkáni potkanů nepremedikovaných dle vzorce:

$$2^{-\overline{\Delta \Delta C_T}} = 2^{-(\overline{\Delta \Delta C_T}^{SudanI} - \overline{\Delta \Delta C_T}^{kontrola})}$$

4 Výsledky

Pro určení obsahu mRNA pro enzym NQO1 v jednotlivých orgánech potkanů, kterým byl podáván Sudan I, jsem nejprve izolovala celkovou RNA. Preparáty celkové RNA jsem reverzní transkripcí s použitím náhodných hexamerů jako primerů převedla na komplementární DNA. Tu jsem následně analyzovala metodou “real-time“ PCR s využitím komerčních sond specifických pro gen pro daný enzym, respektive pro gen referenční.

4.1 Izolace celkové RNA

Izolaci celkové RNA z vybraných tkání potkanů, kterým byl podáván Sudan I, jsem provedla za pomoci činidla Trizol[®] Reagent. Výtěžek jsem posuzovala za pomoci horizontální elektroforézy na agarosovém gelu a měřením absorpčních spekter. V případě výskytu nedegradované RNA ve vzorku by měly při elektroforéze být viditelné 2 pruhy rRNA (28S a 18S), v absorpčním spektru by měl být pozorován pík při 260 nm.

Při izolaci jsem zpočátku vzorky homogenizovala v Trizolu[®] pomocí mlýnku IKA[®] T10a Basic Ultra Turrax[®], postup však nevedl k požadovanému výsledku. Nepozorovala jsem dva proužky RNA (elektroforéza), ani narůst absorbance při 260 nm (měření absorpčních spekter). Usoudila jsem, že kritickým krokem v celém postupu byl zřejmě výše zmíněný způsob homogenizace vzorku.

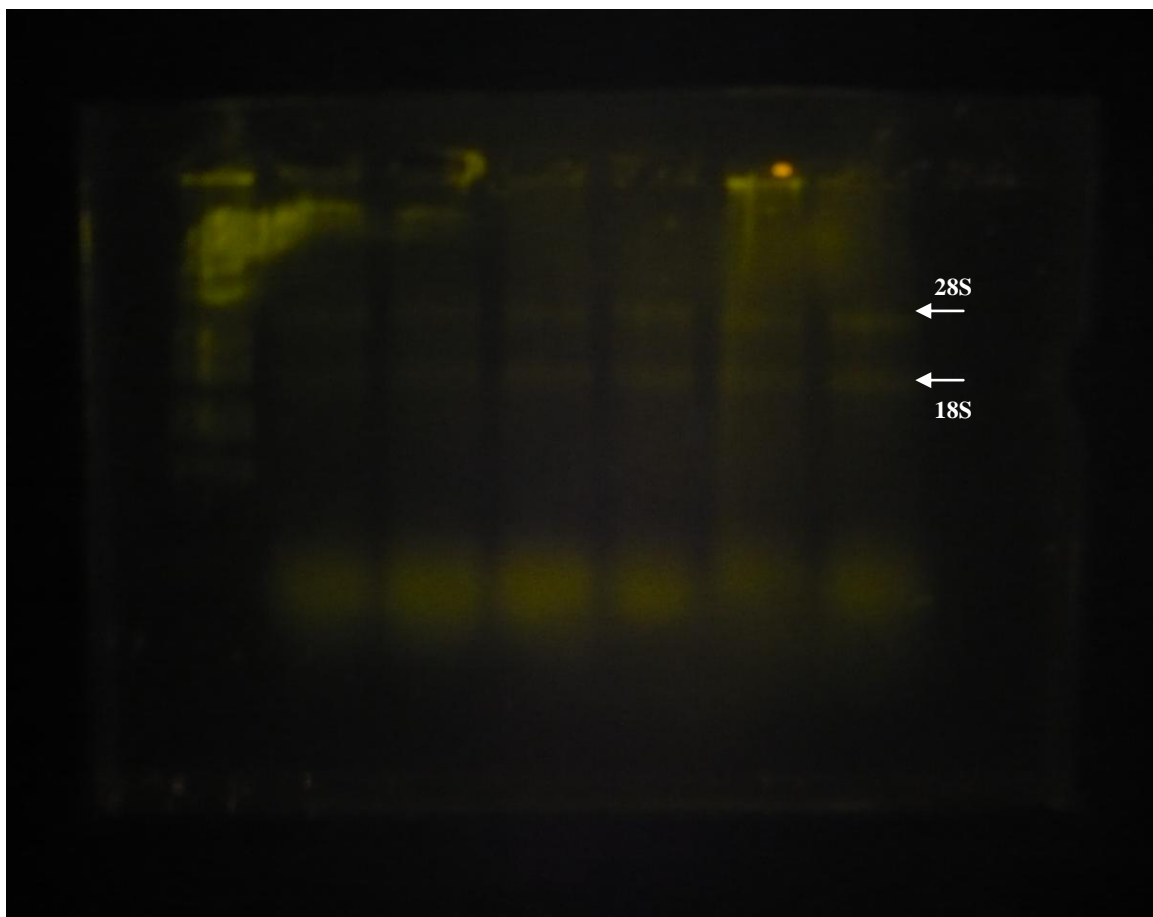
Jako alternativu homogenizačního postupu jsem následně použila kapalný dusík a vzorek jsem rozdrtila pomocí tloučku v keramické misce. Použití kapalného dusíku již vedlo ke spektrofotometrickému stanovení nukleových kyselin ve vzorcích, avšak elektroforéza stále nepřinášela očekávaný výsledek.

Zaměřila jsem se tedy na další kroky izolačního postupu. Testovala jsem, zda nedošlo k degradaci RNA vlivem kontaminovaných chemikálií, a proto jsem si pro další experiment vypůjčila Trizol[®] Reagent a PCR Ultra H₂O ze spolupracující laboratoře RNDr. Součka (SZÚ). Výsledek izolace se však jevil stejný jako za použití chemikálií naší laboratoře.

Další optimalizace jsem tedy uplatnila na metodu elektroforézy. Nahradila jsem TAE pufr TBE puftrem. Dle údajů, které uvádí výrobce v návodu, by mělo barvivo SYBRSafe[™] ochotně barvit RNA, avšak naše zkušenost tento fakt nepotvrdila. Proto jsem pro vizualizaci použila místo SYBRSafe[™] barvivo SYBR[®]Green II RNA gel stain. Právě

díky poslední uvedené optimalizaci se mi podařilo vizualizovat molekuly RNA na agarosovém gelu při elektroforéze ve vzorcích RNA izolované z jater, plic a ledvin.

Příklad vizualizace RNA barvením SYBR[®]Green II ve vzorcích RNA z ledvinné a plicní tkáně ukazuje **obrázek č. 9**. Čistotu a koncentraci izolované RNA jsem stanovovala pomocí měření absorpčních spekter. Získané údaje jsou v **tabulce č. 1**.



Obrázek č. 9 - Vizualizace preparátů celkové izolované RNA při elektroforéze na 1% agarosovém gelu
Aplikované vzorky (zleva): DNA λ -marker, 3x RNA z ledvin, 3x RNA z plic

Tabulka č. 1 - Spektrofotometrické určení čistoty a koncentrace izolované RNA

Vzorky jsem před měřením absorpčních spekter 70x naředila, vzorek “Játra 2“ 140x .

Tkáň	Vzorek	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	Čistota	c(RNA) [μg.μl ⁻¹]
Játra	1	0,6822	0,4180	0,0005	1,63	1,90
	2	0,5980	0,3708	0,0026	1,62	3,33
	3	0,7859	0,4517	-0,0035	1,73	2,20
Plice	1	0,1402	0,1004	0,0386	1,64	0,28
	2	0,1112	0,0780	0,0173	1,55	0,26
	3	0,1151	0,0840	0,0358	1,65	0,22
Ledviny	1	0,2335	0,1560	0,0244	1,59	0,59
	2	0,1742	0,1224	0,0329	1,58	0,40
Varlata	1	0,0833	0,0494	-0,1000	1,23	0,51
	2	0,0782	0,0490	0,0059	1,68	0,20
	3	0,0790	0,0496	0,0070	1,68	0,20
Střeva	1	0,0926	0,0579	0,0093	1,71	0,23
	2	0,1049	0,0639	0,0068	1,72	0,10
	3	0,0155	0,0061	-0,0380	1,21	0,15
Srdce	1	0,4493	0,2637	0,0025	1,71	1,25
	2	0,0819	0,0492	0,0083	1,80	0,21
	3	0,0529	0,0244	-0,0135	1,75	0,19

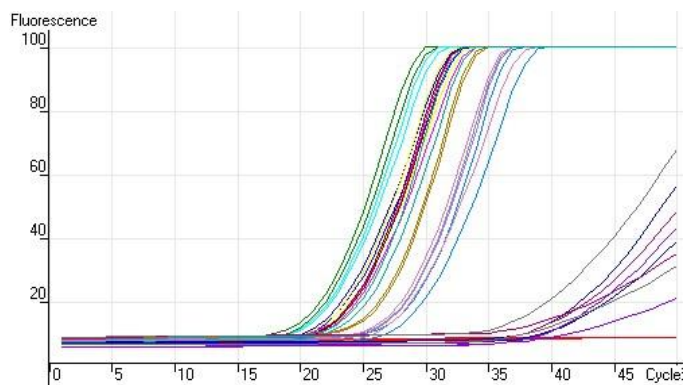
4.2 Kvantifikace získané RNA pro NQO1 pomocí reverzní transkripce a “real-time“ PCR

Reverzní transkripcí jsem z izolované RNA připravila cDNA. Pro tento zpětný přepis jsem vybrala pouze vzorky plic, jater a ledvin, protože u ostatních vzorků tkání jsem neprokázala při elektroforéze přítomnost nedegradované RNA.

Metodu “real-time“ PCR jsem aplikovala nejprve na vzorky cDNA získané reverzní transkripcí z 1 μg RNA. Tyto vzorky vykazovaly příliš nízký obsah cDNA, proto jsem připravila a následně analyzovala cDNA ze 2 μg RNA z plic a ze 3 μg RNA z jater a ledvin. Všechny vzorky plic, ledvin a jater jsem charakterizovala vždy nejdříve z hlediska exprese β-aktinu, který je jako tzv. referenční gen ve všech tkáních exprimován konstitutivně ve stejném množství. Poté jsem provedla analýzu vzorků z hlediska exprese sledovaného genu, tedy *NQO1*.

Obrázek č. 10 a obrázek č.11 znázorňují amplifikační grafy β -aktinu a *NQO1* spolu s příslušnými hodnotami C_T . Data jsem statisticky zpracovala za pomoci vzorců uvedených v kapitole 3.2.6. (str. 28) a výsledky jsem zaznamenala do **tabulky č. 2** a **tabulky č. 3**.

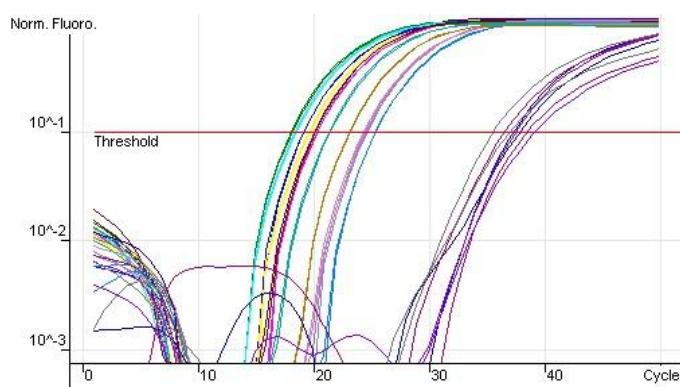
A)



C)

Vzorek	Hodnota C_T	
Blank		
Plíce 1	19,27	19,24
Plíce 2	20,42	20,45
Plíce 3	18,22	18,15
Játra 1	19,81	19,66
Játra 2	18,59	18,47
Játra 3	20,26	20,19
Ledviny 1	25,45	25,49
Ledviny 2	24,73	24,62
Ledviny 3	24,43	24,54

B)



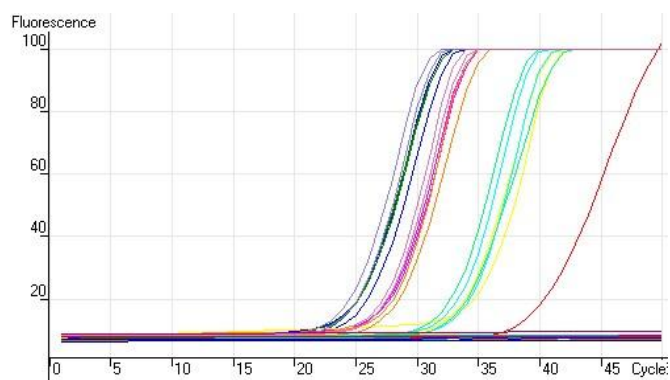
Obrázek č. 10 - Amplifikační graf β -aktinu

A) v lineárním zobrazení

B) v logaritmickém zobrazení s vyznačenou linií “treshold“

C) popis jednotlivých křivek spolu s příslušnými hodnotami C_T

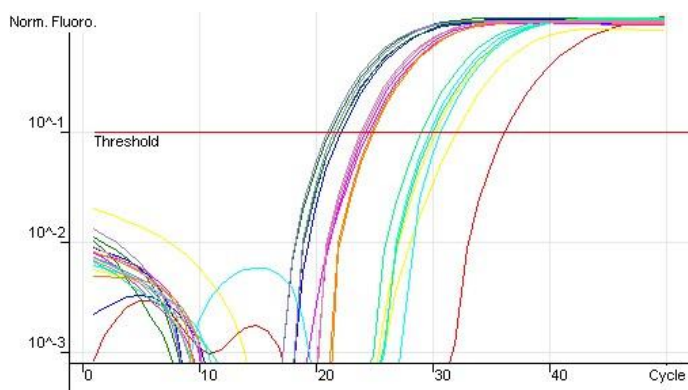
A)



C)

Vzorek		Hodnota C_T	
	Blank		
	Plíce 1	21,95	22,26
	Plíce 2	24,35	24,62
	Plíce 3	21,91	21,36
	Játra 1	25,02	24,90
	Játra 2	21,13	21,67
	Játra 3	23,96	24,13
	Ledviny 1	30,42	32,15
	Ledviny 2	29,86	30,83
	Ledviny 3	29,16	30,15

B)



Obrázek č. 11 - Amplifikační graf *NQO1*

A) v lineárním zobrazení

B) v logaritmickém zobrazení s vyznačenou linií “treshold“

C) popis jednotlivých křivek spolu s příslušnými hodnotami C_T

Tabulka č. 2 - Určení míry exprese *NQO1* v porovnání s referenčním genem vyjádřené jako ΔC_T

S – vzorek tkáně potkana premedikovaného Sudanem I,

K – vzorek tkáně potkana nepremedikovaného Sudanem I (kontrola)

Tkáň	Vzorek	$C_T(NQO1)$	$C_T(\beta-aktin)$	ΔC_T
Plíce	S1	22.11 ± 0.16	19.26 ± 0.03	2,85
	S2	24.49 ± 0.14	20.44 ± 0.20	4,05
	S3	21.64 ± 0.28	18,19 ± 0.20	3,45
Ledviny	S1	31.29 ± 0.87	25.47 ± 0.02	5,82
	S2	30.35 ± 0.49	24.68 ± 0.06	5,67
	S3	29.66 ± 0.50	24.49 ± 0.06	5,17
Játra	S1	24.96 ± 0.06	19.74 ± 0.08	5,22
	S2	21.40 ± 0.27	18.53 ± 0.06	2,87
	S3	24.05 ± 0.09	20.23 ± 0.04	3,82
Plíce	K1	20.40 ± 0.02	15.31 ± 0.00	5,09
	K2	20.75 ± 0.13	15.42 ± 0.01	5,33
	K3	20.59 ± 0.14	14.70 ± 0.02	5,89
Ledviny	K1	28.15 ± 0.18	17.92 ± 0.23	10,23
	K2	28.16 ± 0.22	19.57 ± 0.04	8,59
	K3	27.27 ± 0.08	17.99 ± 0.07	9,28
Játra	K1	26.43 ± 0.21	22.22 ± 0.03	4,21
	K2	25.66 ± 0.03	20.64 ± 0.08	5,02
	K3	24.84 ± 0.19	19.75 ± 0.20	5,09

Tabulka č. 3 - Výpočet průměrné relativní exprese sledovaného genu $\overline{\Delta C_T}$ a určení míry indukce

exprese genu *NQO1* ve vzorcích dané tkáně odebrané z potkanů premedikovaných Sudanem I oproti tkáni potkanů nepremedikovaných

Hodnota $\overline{\Delta C_T}$ uvedená v tabulce představuje průměr 3 vzorků ± SD (směrodatná odchylka).

Orgán	$\overline{\Delta C_T}^{(Sudan)}$	$\overline{\Delta C_T}^{(kontrola)}$	Statistická významnost	Míra indukce $\left(2^{-\overline{\Delta C_T}}\right)$
Plíce	3,45 ± 0,60	5,44 ± 0,41	P<0,01	3,97
Ledviny	5,55 ± 0,34	9,37 ± 0,82	P<0,001	14,12
Játra	3,97 ± 1,18	4,77 ± 0,49	nesign.	1,74

5 Diskuze

Tato bakalářská práce navazuje na dosavadní studie týkající se azobarviva Sudan I, které vznikly v laboratořích katedry biochemie PřF UK, a jejím cílem je doplnit dříve získané výsledky ohledně exprese enzymu DT-diaforasy v tkáních potkana po premedikaci daným azobarvivem.

Doposud provedené studie mimo jiné prokázaly, že enzym DT-diaforasa hraje důležitou roli při redukci Sudanu I.¹ Na biotransformaci tohoto xenobiotika ve větší míře participují oxidační reakce katalyzované zejména zástupci rodiny cytochromů P450 a méně často peroxidasami (viz též **obrázek č. 4**, str. 14). V průběhu oxidačních reakcí katalyzovaných oběma enzymovými systémy může být Sudan I aktivován na reaktivní metabolity, které se kovalentně vážou na nukleové kyseliny a způsobují jejich poškození.²¹ Jako nejefektivnější enzymy aktivující Sudan I u lidí i potkanů byly identifikovány formy CYP1A1 a CYP1A2.^{73, 74, 20, 14, 12, 6}

Sledování exprese biotransformačních enzymů ve tkáních zvířat premedikovaných Sudanem I je předmětem zkoumání již dlouhou dobu. Doposud byla popsána indukce exprese enzymu NQO1 a CYP1A1 azobarvivem Sudan I v játrech potkana⁷⁵ a jeho interakce s Ah receptorem⁶⁰, který indukci zmiňovaných enzymů, CYP1A a NQO1, zprostředkovává.

V naší laboratoři bylo zjištěno, že jsou enzymy CYP1A1 a NQO1 indukovány také v jiných orgánech potkana, a to jak na úrovni exprese proteinu, tak co se týče enzymových aktivit.⁷⁵ Množství indukovaného proteinu bylo zkoumáno prostřednictvím imunochemické detekční metody zvané “Western blotting“, při které byly použity kuřecí polyklonální protilátky proti potkanímu rekombinantnímu CYP1A1 respektive rekombinantní lidské NQO1. CYP1A1/2 byly signifikantně indukovány v mikrosomálních frakcích izolovaných ze všech studovaných orgánů, nejvíce pak v játrech (15,3x), plicích (11,0x), slezině (9,7x) a ledvinách (4,6x). Exprese NQO1 byla nejvíce indukována v plicích (17,4x) a srdci (118,1x). V ledvinách nebyla exprese NQO1 testována.⁷⁴

Aktivita enzymu NQO1 byla zjišťována prostřednictvím sledování oxidace kofaktoru NADH během redukce menadionu při inkubaci s cytosolickými vzorky z různých tkání potkanů premedikovaných Sudanem I. Enzymová aktivita NQO1 byla vlivem Sudanu I zvýšená ve všech orgánech (vyjma mozkové tkáně), nejvyšší indukce byla v tomto případě popsána v plicích (14,2x), játrech (4,6x), srdci (4,0x) a slezině (3,0x). Katalytické aktivity

CYP1A1/2 detekované jakožto mikrosomální oxidace 7-ethoxyresorufinu a Sudanu I byly také působením Sudanu I zvýšeny ve všech orgánech, zejména však v játrech (7,8x) a ledvinách (83,2x).⁷⁴

Při studiu exprese enzymů CYP1A1 a CYP1A2 na úrovni mRNA v orgánech potkanů premedikovaných Sudanem I byla identifikována vysoká míra indukce CYP1A1 v játrech (55,4x) a plicích (41,0x) a vysoká míra indukce CYP1A2 v ledvinách (25,7x).⁷⁶

V této práci jsem stanovovala míru indukce enzymu NQO1 sledováním vzrůstu obsahu sekvencí mRNA kódujících daný protein v jednotlivých tkáních potkanů po premedikaci Sudanem I. Odhalila jsem zvýšenou expresi NQO1 v plicích (4,0x) a zvláště vysokou indukci exprese NQO1 v ledvinách (14,1x). V játrech byla indukce daného enzymu nesignifikantní (1,7x).

Na základě vzájemné konfrontace výsledků získaných v předchozích studiích pocházejících z naší laboratoře a výsledků prezentovaných v této bakalářské práci je tedy možno konstatovat, že působení Sudanu I na organismus vede u potkanů k indukci NQO1 v různých tkáních prostřednictvím zvýšení exprese příslušného genu. Vzhledem k tomu, že u potkanů dochází působením Sudanu I v testovaných orgánech k ovlivnění exprese NQO1 a současně CYP1A1/2 na všech sledovaných úrovních, mohl by být vysvětlením právě mechanismus navázání Sudanu I na Ah receptor, jehož prostřednictvím může být exprese NQO1 a zároveň CYP1A řízena. Výsledky této práce tedy hovoří pro to, že při opakované expozici je Sudan I schopen prostřednictvím Ah receptoru modulovat své působení *in vivo*.

Závěr

Úspěšně jsem izolovala celkovou RNA z jednotlivých orgánů potkanů, jimž byl podáván Sudan I. Za pomoci reverzní transkripce jsem převedla RNA na cDNA s využitím náhodných hexamerů jako primerů. Metodou “real-time“ PCR s použitím specifických sond jsem kvantifikovala zastoupení mRNA pro enzym NQO1 v orgánech potkanů, jimž byl podáván Sudan I, relativně vůči kontrolnímu genu s konstantní expresí (β -aktin). Porovnala jsem získané výsledky jednotlivých orgánů pro premedikované a nepremedikované potkany a zjistila jsem, že Sudan I vyvolal indukci exprese NQO1 v ledvinách a plicích (14- resp. 4-násobné množství mRNA oproti kontrole).

Seznam použité literatury

- ¹ Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: *Chem. listy*, 98, 876 – 890, (2004)
- ² Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: *Chem. Listy*, 94, 913-918, (2000)
- ³ Stratil P., Kubáň V.: *Chem. Listy*, 98, 379–387, (2004)
- ⁴ *IARC Monog. Eval. Carc.*, Lyon, 8, 225, (1975)
- ⁵ Nahla A. G., Refat A., Ibrahim Z.S., Moustafa G.G., Sakamoto K.Q., Ishizuka M., Fujita S.: *J. Biochem. Mol. Toxic.*, 22, 77-84, (2007)
- ⁶ Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Hodek P., Frei E.: *Cancer Res.*, 62, 5678-5684, (2002)
- ⁷ Øllgaard H., Frost L., Galster J., Hansen O.C.: Survey of azo-colorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental aspects, Danish Environmental Protection Agency, Miljøprojekt, 147-343, (1998)
- ⁸ Chung K.T., Cerniglia C. E.: *Mutat.Res-Rev genet.*, 277, 201-220, (1992)
- ⁹ Møller P., Wallin H.: *Mutat. Res.*, 462, 13–30, (2000)
- ¹⁰ Xu H., Heinze T.M., Chen S., Cerniglia C.E.: *Appl. Environ. Microb.*, 73, 7759-7762, (2007)
- ¹¹ Viz: <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/price/azo.htm>, 5.1. 2010, 16:00
- ¹² Martínek V.: Studium mechanismu působení karcinogenního azobarviva Sudanu I (1-fenylazo-2-naftolu), Disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie, 22-25, (2003)
- ¹³ Abraham M.H., Amin M., Zissimos A. M.: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4, 5748-5752, (2002)
- ¹⁴ Martínek V., Stiborová M.: *Collect. Czech. Chem. C.*, 67, 1883-1898, (2002)
- ¹⁵ *The EFSA Journal*, 263, 1-71, (2005)
- ¹⁶ Kgzuka T., Tashmiro M., Sano S., Fujimoto K., Nakanuta Y., Hashimoto S., Nakaminami G.: *Contact Dermatitis*, 6, 330-336, (1980)
- ¹⁷ Stiborová M., Asfaw B., Frei E., Schneider H.H., Wiessler M.: *Collect. Czech. Chem. C.*, 59, 2727-2733, (1994)
- ¹⁸ Stiborová M., Anzenbacher P.: *Collect. Czech. Chem. C.*, 57, 1537-1546, (1992)

- ¹⁹ Stiborová M., Asfaw B., Frei E., Schneider H.H., Wiessler M.: *Chem. Res. Toxicol.*, 8, 489-98, (1995)
- ²⁰ Stiborová M., Frei E., Schmeiser H.H., Wiessler M.: *Carcinogenesis*, 13, 1221-1225, (1992)
- ²¹ Viz:
<http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>, 8.1.2010, 13:27.
- ²² Stiborová M., Martínek V., Schmeiser H.H., Frei E.: *Neuroendocrinol. Lett.*, 27, 35–39, (2006)
- ²³ Jaiswal A.K.: *Biochemistry-US*, 30, 10647-10653, (1991)
- ²⁴ Ankar A., Siegel D., Kepa J.K., Ross D.: *J. Biol. Chem.*, 277, 14060-14067, (2002)
- ²⁵ Hajos A.K.D., Winston G.W.: *Carcinogenesis*, 1991, 12, 697–702, (1991)
- ²⁶ Viz: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1D4A>, 21.1., 2010, 12:20.
- ²⁷ Tedeschi G., Chen S., Massey V.: *J. Biol. Chem.*, 270, 1198-1204, (1995)
- ²⁸ Venugopal R., Pius J., Ying-Hue L., Kimura S., Klein-Szanto A.J.P., Gonzales F.J., Jaiswal A.K. : *J. Biol. Chem.*, 273, 7382-7389, (1998)
- ²⁹ Cadenas E.: *Biochem. Pharmacol.*, 49, 127-140, (1995)
- ³⁰ Chao CH., Zhang Z.F., Berthiller J., Boffetta P., Hashibe M.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers*, 15, 979-987, (2006)
- ³¹ Li R., Bianchet M.A., Talalay P., Amzel L.M.: *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8846–8850, (1995)
- ³² Cui K., Lu A.Y.H., Yang C.S.: *P. Natl. Acad. Sci., USA*, 1043–1047, (1995)
- ³³ Prochaska H.J., Talalay R., Sies H.: *J. Biol. Chem.*, 262, 1931-1934, (1987)
- ³⁴ Thor H., Smith M.T., Hartzell P., Bellomo G., Jewell S.A., Orrenius S.: *J. Biol. Chem.*, 257, 12419–12425, (1982)
- ³⁵ Ross D., Kepa J.K., Winski S.L., Beall H.D., Anwar A., Siegel D.: *Chem-Biol Interact.*, 129, 77–97, (2000)
- ³⁶ Belinsky M., Jaiswal A.K.: *Cancer Metast. Rev.*, 12, 103-111, (1993)
- ³⁷ Edwards Y.H., Potter J., Hopkinson D.A.: *Biochem J.*, 187, 429-436, (1980)
- ³⁸ Martin L.F., Patrick S.D., Wallin R.: *Cancer Lett.*, 36, 341-347, (1987)

- ³⁹ Ross D., Siegel D.: *Free Radical Bio. Med.*, 29, 246-253, (2000)
- ⁴⁰ Schor N.A., Rice B.F., Huseby R.A.: *P. Soc. Exp. Biol. Med.*, 151, 418-421, (1976)
- ⁴¹ Koudstaal J., Makkin B., Overdiep S.H.: *Eur. J. cancer*, 11, 111-115, (1975)
- ⁴² Schlager J.J., Powis G.: *Int. J. Cancer*, 45, 403-409, (1990)
- ⁴³ Cresteil T., Jaiswal A.K.: *Biochem. Pharmacol.*, 42, 1021-1027, (1991)
- ⁴⁴ Nebert D.W., Roe A.L., Dieter M.Z., Solis W.A., Yang Y. and Dalton T.P.: *Biochem. Pharmacol.*, 59, 65-85, (2000)
- ⁴⁵ Hahn M.E.: *Chem-Biol Interact.*, 141, 131-60, (2002)
- ⁴⁶ Bartlomowicz B., Oesch F.: *Biochem. Pharmacol.*, 77, 627-641, (2009)
- ⁴⁷ Mitchell K.A., Elferink C.J.: *Biochem. Pharmacol.*, 77, 947- 956, (2009)
- ⁴⁸ Polland A., Glover E.: *J. Biol. Chem.*, 251, 4936-4946, (1976)
- ⁴⁹ Safe S.: *Toxicol. Lett.*, 120, 1-7, (2001)
- ⁵⁰ Kung T., Murény K.A., White L.A.: *Biochem. Pharmacol.*, 77, 536-546, (2009)
- ⁵¹ Adachi J., Mori Y., Matsui S., Takigami H., Fujino J., Kitagawa H., Miller Ch.A., Kato T., Saeki K., Matsuda T.: *J. Biol. Chem.*, 276, 31475-31478, (2001)
- ⁵² Kohle C., Bock K.W.: *Biochem. Pharmacol.*, 73, 1853-1862, (2007)
- ⁵³ Carver L.A., LaPres J.J., Jaini S., Dunham E.E.,Bradfield CH.A.: *J. Biol. Chem.*, 273, 33580-33587, (1998)
- ⁵⁴ Denison M.S., Pandini A., Nagy S.R., Baldwin E.P., Bonati L.: *Chem-Biol Interact.*, 3-24, (2002)
- ⁵⁵ Fukunaga B.N., Probst M.R., Reisz-Porszasz S., Hankinson O.: *J. Biol. Chem.*, 270, 29270-29278, (1995)
- ⁵⁶ Carver L.A., Bradfield CH. A.: *J. Biol. Chem.*, 272, 11452-11456, (1997)
- ⁵⁷ Pollenz R.S., Sattler C. A., Polland A.: *Mol. Pharmacol.*, 45, 428-438, (1994)
- ⁵⁸ Sovadinová I.: Aktivace Ah receptoru polycyklickými aromatickými dusíkatými heterocykly – vztah struktury a aktivity: Rigorózní práce PřF MU Brno, Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii - RECETOX, str. 15-18, (2006)
- ⁵⁹ Dvořák Z.: Úloha mikrotubulů v buněčné signalizaci aryl uhlovodíkovým a glukokortikoidním receptorem – důsledky v regulaci enzymů metabolizujících léčiva: Habilitační práce, Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, str. 10-12, (2006)

- ⁶⁰ Delescluse C., Lemaire G., de Sousa G., Rahmani R.: *Toxicology*, 153, 73-82, (2000)
- ⁶¹ Ma Q., Baldwin K.T.: *J. Biol. Chem.*, 275, 8432–8438, (2000)
- ⁶² Bernshausen T., Jux B., Esser C., Abel J., Fritsche E.: *Arch. Toxicol.*, 80, 206-211, (2006)
- ⁶³ Hrubá D.: *Hygiena*, 1, Ústav preventivního lékařství, Lékařská fakulta MU, Brno, 23-25, (2009)
- ⁶⁴ Stiborová M.: osobní sdělení
- ⁶⁵ Viz:
http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Nucleic-Acid-Purification-and-Analysis/RNA-Purification/RNA-Purif-Misc/TRIZOL_Brand.html, 10.11. 2009, 17:27.
- ⁶⁶ Simms D., Cizdziel P.E., Chomczynski P.: TRIZOL™: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA, <http://www.invitrogen.co.jp/focus/154099.pdf>, 10.11. 2009, 18:32.
- ⁶⁷ Slater R.J.: Agarose Gel Electrophoresis of RNA, v knize *Experiments in Molecular Biology*, Clifton, str. 121-129, (1986)
- ⁶⁸ Wilfinger W.W., Mackey K., Chomczynski P.: *BioTechniques*, 22, 474-481, (1997)
- ⁶⁹ Viz:
<http://www1.qiagen.com/faq/faqview.aspx?faqid=1023&SearchText=&FaqCategoryId=0&MenuItemId=0&catalog=1&ProductLineId=1000293>, 26.11. 2009, 18:02.
- ⁷⁰ Pavlík E.: Molekulární biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 3, <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>, 26.11. 2009, 22:33, str.25
- ⁷¹ Manuál k TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents, Applied Biosystems, (2002)
- ⁷² Wong M.L., Medrano J.F.: *BioTechniques*, 39, 75, (2005)
- ⁷³ Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Koblas T., Hodek P.: *Cancer Lett.*, 220, 145-154, (2005)
- ⁷⁴ Rýdlová H.: Study on metabolism of industrial carcinogens and their effect on expression of biotransformation enzymes: Disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str.63-71, (2005)
- ⁷⁵ De Long M.J., Prochaska H. J., Talalay P.: *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 787-791, (1986)
- ⁷⁶ Milichovský J.: Vliv kancerogenního azobarviva Sudanu I na expresi biotransformačních enzymů: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie, (2009)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------